

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski studij biologije

Ivona Marić

Obrambeni odgovor biljaka na patogene

Završni rad

Mentor: prof. dr. sc. Elizabeta Has-Schön

Osijek, 2015. godina

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Odjel za biologiju

Završni rad

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

OBRAMBENI ODGOVOR BILJAKA NA PATOGENE

Ivona Marić

Rad je izrađen u: Zavod za biokemiju i ekofiziologiju biljaka, Laboratorij za biokemiju

Mentor: Dr. sc. Elizabeta Has-Schön, prof.

Neposredni voditelj: Dr. sc. Rosemary Vuković

Kratak sažetak završnog rada: Biljke predstavljaju bogat izvor nutrijenata za mnoge patogene te su stoga razvile sofisticirane mehanizme obrane od istih. Ishod interakcija između biljaka i patogena je značajan i za čovjeka, koji ovisi o biljkama za hranu, osim toga biljke pružaju i značajne neprehrambene proizvode. Razumijevanje načina kojim se biljke brane od raznih patogena nužno je kako bi zaštitili našu opskrbu hranom te kako bi razvili visoko otporne biljne vrste. Stoga su znanstvenici puno pažnje posvetili otkrivanju proteina i gena otpornosti koji sudjeluju u mehanizmima obrane biljaka, a ta saznanja pomažu u sprječavanju negativnih učinaka koji su rezultat djelovanja patogena u biljci.

Broj stranica: 19

Broj slika: 3

Broj tablica: 0

Broj literaturnih navoda: 15

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: biljke, biljni patogeni, DAMP molekule, ETI odgovor, hipersenzitivni odgovor (HR), otpornost, PAMP molekule, PTI odgovor, sustavno stečena otpornost (SAR)

Rad je pohranjen u: knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Biology

Bachelor's thesis

Scientific Area: Natural Sciences

Scientific Field: Biology

PLANT DEFENCE RESPONSE AGAINST PATHOGENS

Ivona Marić

Thesis performed at: Subdepartment of Plant Ecophysiology and Biochemistry,
Biochemistry Laboratory

Supervisor: PhD Elizabeta Has-Schön, prof.

Assistant in charge: PhD Rosemary Vuković

Short abstract: Plants represent a rich source of nutrients for many pathogens, therefore they evolved sophisticated mechanisms of resistance against pathogens. The outcome of the interaction between plants and pathogens is important for humans, that depend on plants for food, also plants provide important non-food products. Understanding how plants defend themselves from pathogens is essential in order to protect our food supply and develop highly disease-resistant plant species. Therefore, the scientists devoted much attention to the detection of resistance proteins and genes involved in defense mechanisms of plants, and these findings help to prevent negative effects causing pathogens in plants.

Number of pages: 19

Number of figures: 3

Number of tables: 0

Number of references: 15

Original in: Croatian

Key words: DAMP molecules, ETI response, hypersensitive response (HR), PAMP molecules, plants, plant pathogens, PTI response, resistance, systemic acquired resistance (SAR)

Thesis deposited in: Library of Department of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek and in National university library in Zagreb in electronic form

Sadržaj

1. UVOD	5
2. OPĆI DIO	7
2.1. Biljni patogeni	7
2.2. Prepoznavanje patogena i inducirani obrambeni odgovor	8
2.2.1. Izvanstanično prepoznavanje putem PRR receptora.....	11
2.2.2. Virulencija patogenih efekatora	13
2.2.3. Unutarstanično prepoznavanje efekatora.....	14
2.2.4. Signalni putevi i posljedični odgovori	15
2.3. Hipersenzitivni odgovor	17
2.4. Sustavno stečena otpornost.....	17
2.5. Utjecaj biljnih bolesti na agrokulturu	18
2.6. Napreći istraživanja korisnih u agrokulturi	19
3. ZAKLJUČAK	19
4. LITERATURA	20

1. UVOD

Kako biljke predstavljaju bogat izvor nutrijenata za mnoge organizme poput bakterija, gljiva, kukaca i kralježnjaka, izložene su napadu istih. Iako biljkama nedostaje imunološki sustav kakav postoji kod životinja, biljke su razvile zapanjujući niz strukturnih, kemijskih i proteinskih oblika obrane, koji su odgovorni za otkrivanje napada patogena te za zaustavljanje njihovog djelovanja prije nego su u mogućnosti prouzročiti velike štete. Napad patogena u biljkama izaziva ekspresiju mnogobrojnih obrambenih mehanizama. Odgovarajuća regulacija obrambenih odgovora je vrlo važna za biljke, budući da aktivacija obrambenih odgovora može imati štetan učinak na rast biljaka (Glazebrook, 2005).

Svaka fiziološka abnormalnost ili značajan poremećaj zdravlja predstavlja bolest biljke. Bolest može biti uzrokovana biotičkim čimbenicima, uključujući gljive i bakterije, ili nekim abiotičkim čimbenicima kao što su nedostatak hranjivih tvari, suša, nedostatak kisika, prekomjerna temperatura, ultraljubičasto zračenje ili onečišćenje. Kako bi se zaštitile, biljke su razvile širok spektar konstitutivnih i induciranih obrana. Konstitutivne obrane uključuju mnoge barijere kao što su stanične stjenke, voštana epidermalna kutikula i kora, koje ne omogućuju biljkama samo zaštitu od napada, već im također daju i čvrstoću i krutost. Osim prethodno spomenutih barijera, gotovo sve žive biljne stanice imaju sposobnost otkrivanja napada patogena te odgovora na napad induciranom obranom, kao što je proizvodnja otrovnih kemikalija, enzima koji razgrađuju patogene te namjerno „ubijanje“ vlastitih stanica. Zbog velikog utroška energije i nutrijenata povezanih s njihovom proizvodnjom i održavanjem, biljke proizvode otrovne kemikalije i obrambene proteine tek kada detektiraju patogene (Freeman i Beattie, 2008).

Iako postoje brojni mikroorganizmi koji u interakciji s biljkama izazivaju bolesti, biljke su otporne na većinu patogena. Bolest je iznimka, a ne pravilo u interakciji biljke i patogena. Navedena otpornost se naziva otpornošću širokog spektra. Postoje brojna objašnjenja na pitanje zašto bi biljke bile neprikladne kao domaćini:

1. Biljke ne podržavaju okupatorski životni stil patogena te stoga nisu dobar supstrat za njihov rast;
2. Antimikrobni spojevi i konstitutivne barijere sprječavaju invaziju i širenje patogena;
3. Prepoznavanjem patogena u biljkama se inducira njihov unutarnji višekomponentni obrambeni sustav (Hammond-Kosack i Jones, 1996).

Patogeni često razviju mehanizme kojima nadvladaju biljni obrambeni sustav, što rezultira njihovom kolonizacijom biljke. Tada zaražene biljne vrste postaju domaćini patogenu. Unatoč tome, tijekom evolucije neki su kultivari razvili mehanizme prepoznavanja određenih sojeva ili vrsta patogena, i u skladu s tim proizveli učinkovite odgovore koji vode ka specifičnoj otpornosti određenog kultivara ili vrste (Hammond-Kosack i Jones, 1996).

Prehrana čovjeka gotovo isključivo ovisi o biljkama, osim toga biljke pružaju mnoge važne neprehrambene proizvode poput drveta, boje, tekstila, lijekova, kozmetike, sapuna, gume, plastike, tinte i industrijskih kemikalija. Razumijevanje načina na koji se biljke brane od raznih patogena i biljojeda je nužno kako bi zaštitili našu opskrbu hranom te kako bi razvili visoko otporne biljne vrste (Freeman i Beattie, 2008). Mnogo truda je posvećeno identifikaciji najranijih odgovora na napad patogena, kao i puteva prijenosa signala koji prenose primljenu informaciju, također i identifikaciji transkribiranih gena koji kodiraju proteine obrambenih odgovora. Navedene studije uključuju biokemijsku i fiziološku analizu stanica u kulturi ili analizu cijelih biljaka koje su tretirane patogenima ili pročišćenim elicitorima, kao i kemikalijama koje u biljkama potiču sličan obrambeni odgovor.

2. OPĆI DIO

2.1. Biljni patogeni

Biljni se patogeni prema životnom stilu često dijele na biotrofe i nekrotrofe. Biotrofi tvore čvrstu vezu sa svojim domaćinom kako bi potisnuli obranu biljke i potaknuli otpuštanje hranjivih tvari. Za razliku od biotrofa koji se hrane nutrijentima živih domaćina, nekrotrofi su patogeni koji ubiju tkivo domaćina te se hrane nutrijentima mrtvih ili umirućih stanica (Agrios, 1997). Najbolji primjer biotrofa je oomiceta *Phytophthora parasitica* čiji je domaćin uročnjak (Koch i Slusarenko, 1990). Dobri primjeri su također gljive *Erysiphe orontii* i *Erysiphe cichoracearum*. Kompatibilni izolati ovih gljiva inficiraju epidermalne stanice uročnjaka, razvijaju haustorije te obilno sporuliraju, ali pri tome ne uzrokuju smrt stanica domaćina (Reuber i sur., 1998). Primjeri nekrotrofa su patogene gljive *Botrytis cinerea* i *Alternaria brassicicola*. Obe patogene gljive ubijaju stanice domaćina u vrlo ranim fazama infekcije i uzrokuju opsežna oštećenja tkiva. Patogene gljive proizvode različite fitotoksine koji vjerojatno potiču smrt stanica domaćina (MacKinnon i sur., 1999). Biljni mehanizmi obrane protiv biotrofnih i nekrotrofnih patogena znatno se razlikuju. Do učinkovite obrane biljke od biotrofnih patogena dolazi uslijed programirane stanične smrti koja je povezana s aktivacijom obrambenih odgovora reguliranih signalnim putem ovisnim o salicilnoj kiselini. Nasuprot tome, nekrotrofne patogene ne sprječava stanična smrt, već drugačiji obrambeni odgovor aktiviran signalnim putem ovisnim o jasmoničnoj kiselini i etilenu (Gazebrook, 2005).

Neki patogeni su isključivo biotrofi ili nekrotrofi, međutim mnogi drugi se ponašaju i kao biotrofi i kao nekrotrofi, ovisno o uvjetima u kojima se nađu ili o fazi životnog ciklusa. Takvi se patogeni nazivaju hemi-biotrofi. Mnoge gljive koje se uobičajeno smatraju nekrotrofima su zapravo hemi-biotrofi, budući da imaju biotrofnu fazu u ranom stadiju infekcije. Primjer takvog patogena je bakterija *Pseudomonas syringae*. Bakterija inficira tkivo preko rane, te se umnaža u međustaničnom prostoru. U ranim fazama infekcije ne dolazi do smrti stanica domaćina, dok u kasnijim fazama infekcije dolazi do kloroze i nekoze tkiva (Thaler i sur., 2004).

Mnogi biotrofni i hemi-biotrofni patogeni mogu uzrokovati bolesti kod relativno malog broja biljaka zato što svaka interakcija između patogena i domaćina zahtijeva različit set specijaliziranih gena i molekularnih mehanizama. Opseg domaćina se odnosi na biljne vrste

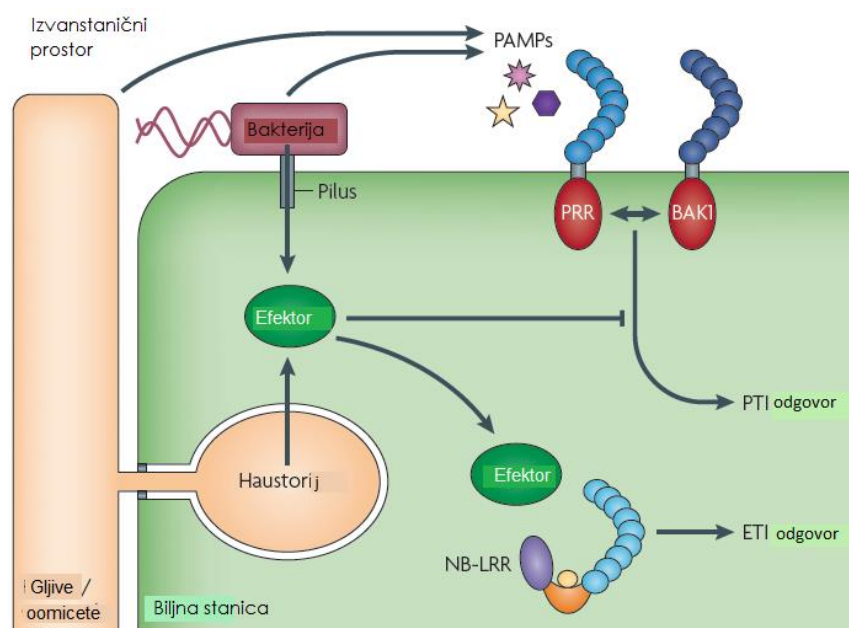
kod kojih je patogen sposoban uzrokovati bolest. Na primjer, brom mozaični virus (BMV) može zaraziti travu, ali ne i mahunarke. Biljne vrste koje ne pokazuju zarazu nakon infekcije patogenom nisu domaćini tim patogenima. Organizmi koji ne uzrokuju bolesti kod niti jedne biljne vrste kao što je saprotrofna bakterijska vrsta *Pseudomonas putida*, nazivamo nepatogenima (Freeman i Beattie, 2008).

2.2. Prepoznavanje patogena i inducirani obrambeni odgovor

Inducirana obrana je fenomen koji biljka posjeduje bez mijenjanja osnovne genetičke konstitucije, a jednom odgovarajuće stimulirana pokazuje pojačanu otpornost na inokulaciju patogena. Inducirajuće sredstvo je nužno za pojačanu obrambenu sposobnost (van Loon, 1997). Višekomponentni obrambeni odgovor, induciran nakon napada patogena, zahtijeva značajan angažman stanica, uključujući opsežno genetičko reprogramiranje, budući je inducirana ekspresija velikog broja obrambenih gena nužnih u borbi protiv napada patogena. Mnogi geni povezani s obranom kodiraju proteine koji posjeduju antifungalnu i antimikrobnu aktivnost ili kodiraju enzime koji kataliziraju obrambene metabolite. Prema tome, obrambeni odgovori su pod čvrstom genetičkom kontrolom te se aktiviraju tek kada je strano tijelo detektirano u biljci. Biljke, za razliku od životinja, nemaju povlasticu cirkulacijskog sustava antitijela, stoga prepoznavanje patogena mora biti sposobnost svake stanice u biljci (McDowell i Woffenden, 2003).

Mikrobni patogeni biljaka gotovo uvijek okupiraju izvanstanične prostore. Usprkos tome, nutrijenti koji omogućuju rast patogena dolaze iz stanica domaćina. Citoplazma i stanični organeli biljke domaćina vrlo su važni za molekularnu interakciju. Biljke su razvile dvije strategije za detekciju patogena (Slika 1). Na vanjskoj strani stanice domaćina su konzervirani mikrobni elicitori - molekularni uzorci povezani s patogenom (PAMP), koje prepoznaju receptori prepoznavanja molekularnih uzoraka (PRR). PAMP molekule su esencijalne komponente patogena, kao npr. bakterijski flagelin ili hitin gljiva. Biljke također odgovaraju i na unutarstanične molekule koje otpuštaju patogeni tijekom invazije, kao što su fragmenti staničnih stjenki ili kutikule. Takve molekule nazivamo molekularni uzorci povezani s oštećenjem (DAMP). Stimulacija PRR receptora dovodi do imunosti potaknute PAMP molekulama (PTI). Drugi oblik percepcije uključuje prepoznavanje patogenih virulentnih molekula (efektora) unutarstaničnim receptorima. Ovaj oblik prepoznavanja

inducira imunost potaknutu efektorima (ETI). Navedeni model prepoznavanja dovodi do koevolucijske dinamike između biljaka i patogena koji se dosta razlikuje od PTI imunosti. Za razliku od PAMP molekula, efektori su promijenjivi i fakultativni. Unutar i između vrsta prisutna je ekstremna diverzifikacija ETI receptora i efektor patogena, dok su neke funkcije PRR molekula očuvane široko među porodicama. Općenito, PTI i ETI daju slične odgovore, iako je ETI kvalitativno jači i brži te često uključuje oblik lokalizirane smrti stanice koji se naziva hipersenzitivni odgovor (HR). PTI je općenito učinkovit protiv neprilagođenih patogena u fenomenu koji se naziva ne-domaćinska otpornost, dok je ETI aktivan protiv prilagođenih patogena. Ti odnosi nisu isključivi te ovise o molekulama elicitora u svakoj infekciji zasebno (Dodds i Rathjen, 2010).



Slika 1. Načela biljne imunosti. Bakterijski patogeni biljaka šire se isključivo u izvanstaničnim prostorima biljnih tkiva. Većina gljivičnih patogena i oomiceta također pružaju svoje hife u izvanstanične prostore, iako neki od njih stvaraju specijalizirane hranidbene strukture – haustorije, koji prodiru kroz staničnu stjenku domaćina, ali ne i kroz plazma membranu. Druge gljive pružaju svoje hife u biljnu stanicu, ali opet ne prolaze membranu domaćina. Molekule otpuštene iz patogena u izvanstanične prostore kao što su lipopolisaharidi, flagelin i hitin (PAMP molekule) prepoznaju PRR receptore i izazivaju PTI imunost. PRR receptori se sastoje od izvanstanične domene bogate leucinom (LRR; plavo) i od unutarstanične kinazne domene (crveno). Većina PRR molekula stupa u interakciju s srodnim BAK1 (engl. *brassinosteroid intensive 1-associated kinase 1*) proteinima kako bi potaknula signalni put PTI. Bakterijski patogeni donose efektorske proteine unutar stanice domaćina putem sekrecijskog pilusa, dok gljive i oomicete efektore donose iz haustorija ili drugih unutarstaničnih struktura dosada još nepoznatim mehanizmom. Navedeni unutarstanični efektori često potiskuju PTI imunost. Većina njih prepoznaju unutarstanični nukleotid-vezajući receptori ((NB)-LRR) koji potiču ETI imunost. NB-LRR proteini sadrže LRR domenu na karboksi-terminalnom kraju (svijetloplavo), središnju NB domenu (narančasto u obliku polumjeseca) koji vežu ATP ili ADP (okruglo žuto), a na amino-terminalnom kraju sadrže Toll, interleukin-1 receptor, protein otpornosti (TIR) ili domenu u obliku dvostruke zavojnice (CC; ljubičasto). Preuzeto i modificirano prema Dodds i Rathjen, 2010).

2.2.1. Izvanstanično prepoznavanje putem PRR receptora

Prepoznavanje podražaja stanica podrazumijeva fizičku interakciju podražaja sa staničnim receptorima. Bez izuzetka, receptori su proteini. Funkcija receptora podrazumijeva prepoznavanje podražaja i naknadnu aktivaciju nizvodnih elemenata signalnih prijenosnih puteva. Među zadacima efektoru su transformacija i pojačavanje signala. Efektori se obično ne mijenjaju vezanjem receptora. Receptori mogu biti smješteni u membrani, plazmi i u jezgri ili u staničnoj stijenci. Podražaj najčešće dolazi izvana te ne može prodrijeti kroz plazma membranu pa proces uključuje prijenos informacije preko plazma membrane. To je omogućeno vezanjem liganada za proteine integrirane u plazma membrani, membranski lokaliziranim receptorima. Neke hidrofobne molekule mogu prodrijeti kroz plazma membranu i kroz receptore na površini ili receptore unutar stanice (Trewavas, 2000).

PRR receptori

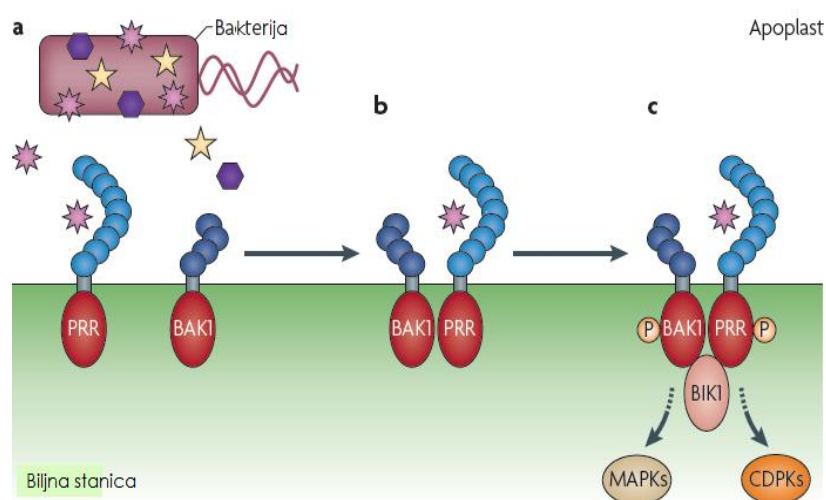
Dosada poznati PRR receptori dijele se u dva razreda receptora: transmembranske receptorske kinaze i transmembranski proteini slični receptorima. Porodica gena receptorskih kinaza prošla je veliku ekspanziju u biljkama; na primjer, oko 610 članova prisutni su u genomu biljke *Arabidopsis thaliana*, a mnogi od njih su osjetljivi na biotički stres. Ista biljka, sadrži 57 članova razreda receptora nalik proteinu (Dodds i Rathjen, 2010).

PAMP molekule koje prepoznaju biljke su raznolike i uključuju proteine, ugljikohidrate, lipide i male molekule kao što su adenzin-tri-fosfat (ATP). Prepoznavanje PAMP molekula najbolje je proučeno kod receptorske kinaze osjetljive na flagelin 2 (*flagellin sensing* 2, FLS2) vrste *A. thaliana*, koja izravno veže bakterijski flagelin te zatim sklopi aktivni signalni kompleks. Iako koncept PAMP molekula obuhvaća zamisao da bi sve PAMP molekule trebale biti prepoznate od strane svih vrsta, dokazano je da to nije uvijek slučaj (Dodds i Rathjen, 2010).

BAK1- središnji regulator PTI imunosti

Većini poznatih PRR receptora za rad potrebna je receptor kinaza bogata leucinom (LRR) neosjetljiva na brasinosteroid (engl. *brassinosteroid insensitive 1-associated kinase1*, BAK1; Slika 2). Izuzetak je receptor hitina gljiva - hitin elicitor receptor kinaza 1 (CERK1), koji također odgovara na bakterijsku PAMP molekulu. BAK1 je dio porodice koja se sastoji od pet somatskih embriogenetskih receptorskih kinaza (SERK) te je poznat i kao SERK3. BAK1 nema izravnu ulogu u prepoznavanju elicitora, ali FLS2 brzo nakon elicitacije tvori

kompleks s BAK1. Navedena interakcija rezultira fosforilacijom oba proteina koja doseže vrhunac 30-60 sekundi nakon elicitacije. Jedan potencijalni regulator kompleksa FLS2-BAK1 je citoplazmatski protein - kinaza potaknuta botritisom 1 (BIK1). BIK1 je identificiran kao potencijalni regulator, budući je gen *bak1* aktiviran nakon tretiranja listova biljke *A. thaliana* patogenima ili elicitorima. BIK1 reagira s FLS2 i s BAK1 prije elicitacije te disocira nakon elicitacije. BAK1 ima ulogu i u percepciji s drugim elicitorima, vjerojatno također heterodimerizacijom s PRR receptorima. Kao takav, BAK1 je središnji regulator imunosti biljaka i stoga je meta više efektnih molekula zaraze patogena (Dodds i Rathjen, 2010).



Slika 2. Stvaranje aktivnog PRR kompleksa. a) Infektivni patogeni kao što su bakterije, prebacuju PAMP molekule (rozi, žuti i ljubičasti oblici) u apoplast gdje ih prepoznaju PRR receptori. b) Odmah nakon vezanja liganda, PRR receptor tvori aktivni kompleks s kinazom BAK1. c) To rezultira transfosforilacijom kinazne domene PRR i BAK1. Signaliziranje putem ovog aktivnog kompleksa može biti posredovano izravno s BIK1 ili s protein kinazama aktiviranih mitogenom (MAPKs) ili protein kinazom ovisnom o kalciju (CDPKs). Ovo je opći model koji se temelji na receptoru bakterijskog flagelina (FLS2). Preuzeto i modificirano prema Dodds i Rathjen, 2010).

2.2.2. Virulencija patogenskih efektor

Uspješni patogeni su u mogućnosti potisnuti PTI odgovore i tada se umnožavaju i uzrokuju bolest. Potiskivanje odgovora postižu pomoću proteina efektor. Individualni sojevi fitopatogena kodiraju 20-30 efektor koji su znatno regulirani te se izlučuju izravno u citoplazmu domaćina posebnom igličastom strukturom (sekrecijski sustav tip 3, TTSS). Opseg individualnih efektor drastično varira među usko povezanim bakterijskim sojevima. Mnogi efektori izravno interferiraju s PTI odgovorima, a mutanti bakterija kojima nedostaje TTSS sustav nisu patogene. Velik broj primjera pokazuje kako transgena ekspresija pojedinog tip-3 efektor u biljci domaćinu vraća mogućnost rasta bakterijskih mutanata, što upućuje na to da patogenost bakterija zahtjeva samo potiskivanje PTI odgovora (Dodds i Rathjen, 2010).

Bakterijski efektori

Bakterijski efektori imaju molekularne ili enzimске aktivnosti koje određuju njihovu sposobnost modificiranja meta u domaćinu i njihovo unutarstanično prepoznavanje pomoću ETI receptora. Otpuštanje receptora je prikazano kod efektor *Pseudomonas syringae*, AvrPto i AvrPtoB čija je meta FLS-BAK1 kompleks. Općenito je prihvaćeno da AvrPtoB koristi dvostruku strategiju za potiskivanje rada kinaze: domena koja cilja kinazu dovoljna je za potiskivanje odgovora flagelinom, a njegova E3 ligazna domena može označiti protein kinaze s ubikvitinom kako bi ih usmjerila na razgradnju. AvrPtoB cilja pet kinaza domaćina iz razreda kinaza povezanih s Pto/interleukinskim receptorom (IRAK). Isto tako, AvrPto potiskuje PRR receptor kinaze, vjerojatno djelujući kao inhibitor kinaza. Ovi efektori su dio bakterijske strategije koja nespecifično cilja kinaze biljke domaćina (Dodds i Rathjen, 2010).

Eukariotski efektori

Podaci o eukariotskim efektorima i njihova funkcija su manje poznati u usporedbi sa bakterijskim. Gljivični i oomicetalni patogeni proizvode efektore koji se izlučuju kroz endomembranski sustav te ulaze u stanicu domaćina zasad nepoznatim mehanizmima. Efektori oomiceta sadrže motiv Arg-X-Leu-Arg (RXLR; gdje je x bilo koja aminokiselina) koji im je potreban za ulazak u biljnu stanicu. Masivan porast u opsegu eukariotskih efektor, u odnosu na opseg bakterijskih efektor, može ukazivati na zahtjeve različitih funkcija efektor od strane eukariotskih patogena, vjerojatno kako bi podržali stjecanje specijaliziranih hranidbenih strategija (Dodds i Rathjen, 2010).

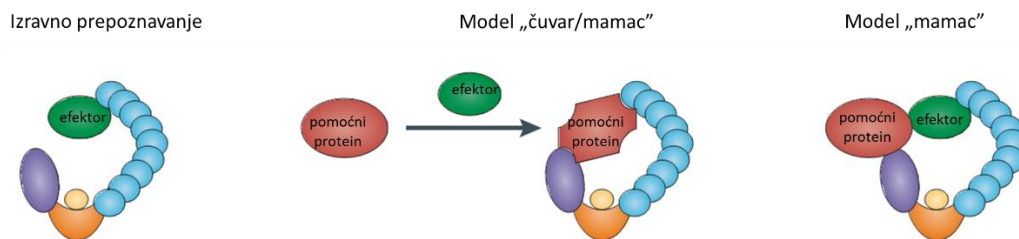
2.2.3. Unutarstanično prepoznavanje efektor

ETI je drugi mehanizam prepoznavanja patogena u biljkama a temelji se na unutarstaničnom prepoznavanju efektorskih proteina. Prepoznavanje je najčešće posredovano razredom receptorskih proteina koji uključuju NB domenu i LRR domenu (Slika 1). Biljni NB-LRR proteini potvrdili su otpornost na različite patogene, uključujući gljive, oomicete, bakterije, viruse i insekte. Mnogi biljni NB-LRR proteini također sadrže na amino-terminalnom kraju TIR (Toll, interleukin-1 receptor, protein rezistencije) domenu. Drugi uobičajeni razred NB-LRR proteina na amino-terminalnom kraju sadrži CC domenu, dok ostali nemaju konzerviranu amino-terminalnu regiju (Dodds i Rathjen, 2010).

Izravno i neizravno prepoznavanje

NB-LRR proteini mogu prepoznati efekte patogena ili izravno fizičkim povezivanjem ili neizravno putem pomoćnog proteina, koji je dio NB-LRR proteinskog kompleksa (Slika 3). Općenito, izravno prepoznavanje pokazano je metodom kvašćevog sustava dvaju hibrida (Y2H), u nekim slučajevima i *in vitro* analizom proteinskih interakcija .

Neizravno prepoznavanje efektor promatrano je u mnogobrojnim slučajevima. Kod najbolje opisanih modela, interakcija efektor je posredovana pomoćnim proteinom koji predstavlja metu patogene virulencije ili je strukturna imitacija jednog. Efektor uzrokuje promjene pomoćnog proteina što omogućuje prepoznavanje pomoćnog proteina NB-LRR proteinom. Ova strategija zaobilazi evolucijsku prilagodbu bržeg razvoja patogena te domaćin iskorištava tu strategiju kako bi uspješno prepoznao patogena. Kod izravnog prepoznavanja, izvršitelj pokreće prijenos signala tako što se fizički veže na receptor. Kod modela „čuvar/mamac“ izvršitelj modificira pomoćni protein koji može biti njegova meta zaraze ili strukturalno oponaša metu (mamac). Promijenjeni pomoćni protein prepoznaje NB-LRR receptor. Kod modela „mamac“, vezanje efektor s pomoćnim proteinom olakšava izravno prepoznavanje s NB-LRR receptorom (Slika 3; Dodds i Rathjen, 2010).



Slika 3. Modeli izravnog i neizravnog prepoznavanja patogenih efektor. Preuzeto i modificirano prema Dodds i Rathjen, 2010.

Aktivacija NB-LRR

NB-LRR predstavlja prekidač koji se sastoji od većeg broja domena koje prevode izravni ili neizravni signal patogena u opći imuni odgovor. Dosadašnja genetička istraživanja su pokazala kako LRR domena često kontrolira specifičnost prepoznavanja, s tim da LRR posreduje efektorskoj interakciji u ovim sustavima. Često su LRR domene koje sudjeluju u neizravnom prepoznavanju konzervirane, te se smatra da izravni i neizravni odgovor uključuju bitno različit NB-LRR proces aktivacije. U odsutnosti efektor, NB-LRR proteini se održavaju u suzdržanoj konformaciji. U nekim neizravnim sustavima prepoznavanja, negativna regulacija NB-LRR pomoćnim proteinom pokreće se pomoću efektor, što je dovoljno za aktivaciju ETI odgovora. U drugim slučajevima NB-LRR molekule su autoinhibirane, odnosno unutarmolekularna interakcija drži protein u neaktivnoj konformaciji dok nije narušena efektorom. Vezanje nukleotida s NB domenom presudno je za funkciju svih biljnih NB-LRR proteina, a aktivacija signala može uključivati pretvorbu ATP-a u ADP na vezajućoj strani. (Dodds i Rathjen, 2010).

2.2.4. Signalni putevi i posljedični odgovori

Poznati su brojni stanični događaji povezani s PTI i ETI odgovorima, koji su u korelaciji. To uključuje brzi ulaz iona kalcija iz vanjskih pričuva, eksploziju aktivnih kisikovih jedinki, aktivaciju protein kinaze aktivirane mitogenom (MAPKs), reprogramiranje ekspresije gena, odlaganje kalozne stanične stjenke na mjestu pokušaja infekcije te često lokalizirana stanična smrt (HR). Postoje opsežna preklapanja među obrascima ekspresije gena izazvanih PAMP molekulama. Ekspresija gena uglavnom je slična kod PTI i kod ETI odgovora, ukazujući na sličnost u ukupnom odgovoru, dok se razlikuje u opsegu. Signalni

putevi su važni za razumijevanje imunosti biljaka. Oni se aktiviraju odmah nizvodno od aktivacije PRR i NB-LRR proteina (Dodds i Rathjen, 2010).

Signalizacija kinazama

MAPK putevi signalizacije su sveprisutne prijenosne signalne komponente u eukariota te prenose signal od izvanstaničnih receptora do staničnih odgovora. MAPK kaskada reakcija se obično sastoji od kompleksa sastavljenog od MAPK kinaza kinaze (MAPKK) koja fosforilira MAPK kinazu (MAPKK), a koja zatim fosforilira MAPK. Taj put regulira aktivnost različitih supstrata kao što su transkripcijski faktori i protein kinaze. Važno je napomenuti da su MAPK kaskade reakcija uključene i u PTI i u ETI (Dodds i Rathjen, 2010).

Imunitet potaknut efektorima

Većina gena identificiranih kao ETI supresori su geni ili specifični za sustav prepoznavanja, kao što su pomoćni proteini za prepoznavanje, ili su članovi šaperonskog kompleksa potrebnog za funkciju većine NB-LRR proteina. Samo je nekoliko pravih signalnih proteina identificirano. Protein poboljšane osjetljivosti na bolesti (EDS1 protein) potreban je za signaling svih TIR-NB-LRR molekula do sada ispitivanih, što upućuje na njegovu specifičnu ulogu u prijenosu signala TIR domene. Jednako tako, integralni membranski protein otpornosti na bolesti nespecifične za soj (NDR1 protein) potreban je za signaling CC-NB-LRR molekula koje su povezane membranom, međutim koraci mehanizma spajanja nisu poznati. Vrlo je mali broj elemenata neophodnih u signalingu ETI imunosti, te postoji mogućnost da neki putevi signalni putevi djeluju paralelno. Unatoč poteškoćama kod identificiranja komponenti, nedavno je predložen zanimljiv model ETI signalinga. Prema tome modelu, aktivacijom se NB-LRR molekule premjeste u jezgru, gdje dolazi do interakcije s nuklearnim faktorima kako bi se potaknule promjene u ekspresiji gena (Dodds i Rathjen, 2010).

Posljedični odgovori

Neki od posljedičnih odgovora na PTI i ETI su bolje proučeni nego signalni putevi. Hormonski putevi salicilne kiseline (SA) i etilen (ET)/jasmonične kiseline (JA) važni su u regulaciji ekspresije obrambenih gena. Ova dva puta djeluju antagonistički. SA put sudjeluje u otpornosti na biotrofne patogene, a JA-ET put uključen je u odgovore na nekrotrofne patogene. Iako je puno razlika u ekspresiji gena između ova dva puta, osim toga nekoliko gena su specifični markeri aktivacije SA ili JA-ET puta, postoje i sličnosti među njima. Istraživanja su pokazala da SA i JA-ET putevi djeluju sinergistički kod PTI imunosti kako bi

pojačali odgovor. To može objasniti zašto je većina efektor patogena u mogućnosti suzbiti PTI odgovor u interakciji s različitim metama. Budući da je signal sam po sebi slab, blokiranje samo jedne komponente dovoljno je za zbunjivanje odgovora. ETI odgovor je jači i uključuje aktivnosti SA i JA-ET puta. Tako, čak i u nedostatku SA signaliziranja, JA-ET odgovor doprinosi održavanju značajne razine otpornosti na patogene. Unatoč broju promjena u ekspresiji gena, koje su rezultat aktivacije PTI ili ETI odgovora, ključne promjene koje rezultiraju sprječavanjem rasta patogena nisu jasne u svim sustavima. Moguće je da mnogi odgovori pojedinačno imaju mali učinak, te je individualni doprinos teško kvantificirati, ali je vjerojatno i da postoje različiti odgovori, učinkoviti protiv različitih vrsta patogena (Dodds i Rathjen, 2010).

2.3. Hipersenzitivni odgovor

Hipersenzitivni odgovor (HR) je odgovor na napad patogena koji se pojavljuje na mjestu infekcije. Ovaj odgovor može biti odgovoran za otpornost na bolest ili posljedica aktivacije drugih obrambenih odgovora. HR uključuje brzu lokaliziranu nekrozu zaražene biljne stanice i/ili tkiva. Svrha samožrtvovanja je lišiti patogena hranjivih tvari ili otpuštanje mikrobiocidnih spojeva umirućih stanica kako bi se ograničilo širenje patogena na mala područja, okružujući prvu zaraženu stanicu. HR može uključivati samo jednu stanicu ili može prouzročiti smrt opsežnih regija tkiva. Drugi događaj tijekom hipersenzitivnog odgovora je proizvodnja signalnih molekula kao što su etilen, jasmonična i salicilna kiselina, koje pomažu u prijenosu signala u druge dijelove biljke i induciraju sustavno stečenu otpornost (Dangl i sur., 1996).

2.4. Sustavno stečena otpornost

Izraz sustavno stečena otpornost (SAR) je prvi upotrijebio A. F. Ross 1961. godine kako bi opisao induciranu otpornost koju je otkrio u distalnim, netretiranim listovima biljaka zaraženih virusom mozaika duhana (TMV). Sustavno stečeni odgovor odnosi se na poseban put prijenosa signala koji je aktiviran stvaranjem lokalnih nekrotičnih lezija u obliku HR u nekompatibilnim reakcijama, ili kao simptom bolesti u kompatibilnim reakcijama. Izazivanje sustavno stečene otpornosti štiti biljku od širokog spektra patogena, te se može detektirati ekspresija barem devet porodica gena nazvanih SAR-geni. Za mnoge biološka funkcija nije poznata, ali neki imaju neposrednu ulogu u stvaranju otpornosti kodiranjem proteina s poznatom antimikrobnom ili degradacijskom aktivnošću kao i s mogućnosti poticanja bržeg

obrambenog odgovora stanice u odnosu na neinduciranu biljaku. Analiza produkta gena SAR otkrila je kako mnogi od njih pripadaju razredu proteina povezanih s patogenezom (PR). SAR proteini mogu biti korisni molekularni markeri SAR-a. Salicilna kiselina se pojavljuje kao važan dio prijenosa signala vodećeg lanca ekspresije PR proteina (Maleck i Dietrich, 1999).

2.5. Utjecaj biljnih bolesti na agrokulturu

Ljudska populacija je porasla za više od duplo u proteklih pedeset godina, a do 2050. se predviđa porast preko devet bilijuna. Porast ljudske populacije zahtijeva sve veći porast proizvodnje u agrokulturi. Taj izazov još je više otežan zbog činjenice da promjene u klimatskim i okolišnim uvjetima, pod kojima se uzgajaju usjevi, rezultira pojavom novih bolesti, s obzirom na to da promjene unutar patogena rezultiraju gubitkom prethodno učinkovitih izvora otpornosti. Da bi se nosili s tim izazovom, upotrebljavaju se napredne genetičke i statističke metode kako bi se identificirali novi otporni geni, te se rade studije o odnosu između biljaka i patogena kako bi se otkrili mehanizmi kojima se postiže otpornost na bolesti.

Iako mnogi čimbenici doprinose smanjenju proizvodnje hrane širem svijeta, uključujući ekonomske i socijalne čimbenike, širenje urbanizacije, proizvodnju bioenergije i marginalizaciju zemljišta za agrokulturu, jasno je da sigurnost hrane zahtijeva održivu agrokulturnu proizvodnju, posebno proizvodnju žitarica kao što su pšenica, riža i kukuruz. Biotički stres, uključujući bakterijske i gljivične patogene, velika je smetnja proizvodnji. Za pšenicu su se proteklih godina dogodile značajne promjene u tretiranju patogena. Primjerice, godine 1999. u istočnoj Africi novi oblik vrste *Puccinia graminis*, glavni uzročnik hrđe stabljike, prevladala je specifični gen otpornosti *Sr31* prisutan u 70% slučajeva kultivara pšenice. 2000. godine nova i puno agresivnija vrsta patogena *Puccinia striiformis* se pojavila u SAD-u te je uzrokovao epidemiju koja se proširila srednjim zapadom. Ovi primjeri ukazuju na potrebu za boljim razumijevanjem interakcija biljaka i patogena, te primjenom tih spoznaja u agrokulturnoj strategiji. Robert McIntosh i Zakkie Pretorius su zgodno frazirali: „Uzgoj pšenice za kontrolu bolesti nije potpun, osim ako smo obuhvatili sve aspekte varijabilnosti i epidemiologije patogena, otkriće otpornosti i gensku karakterizaciju, razvoj germplazmi i zadržavanje otpornosti u konkurentnim sortama visokog prinosa i velike kvalitete s dovoljnom prilagodbom za usvajanje u agrokulturi“ (Boyd i sur., 2013).

2.6. Napreci istraživanja korisnih u agrokulturi

Uzgajivači biljaka su prepoznali važnost otpornosti gena na bolesti u poljoprivrednim kulturama. Mnogi od ovih gena kodiraju ETI receptore, a patogeni mogu nadvladati te gene kroz gubitak ili izmjenu prepoznatih efektor. Oprezan razvoj gena otpornosti u poljoprivrednim kulturama, posebice koristeći učinkovite receptore u kombinaciji i s odabranim ciljanim efektorima koji imaju presudnu virulentnu ulogu, bi trebao omogućiti znatno trajniju otpornost. Mnogi NB-LRR geni su klonirani što može olakšati njihovu upotrebu u poljoprivredi, bilo putem konvencionalnog uzgojnog pristupa, u kojem se klonirane sekvence koriste kao molekularni markeri, ili kao transgeno sredstvo. Sekvenciranje genoma biljnih patogena omogućilo je dug popis proteina efektor koji mogu biti prepoznati od strane biljnih imunih receptora, što bi to moglo omogućiti i nove izvore otpornosti. Taj pristup je već korišten, kod divljih krumpira, kod identificiranja novih izvora otpora na patogen truleži krumpira *Phytophthora infestans*. PTI receptori obično nisu varijabilni unutar vrste te kao takvi nisu znatno doprinijeli tradicionalnim naporima uzgoja (Dodds i Rathjen, 2010).

Korištenje gena za razvoj sorti otpornih na bolesti su dobra alternativa pesticidima i drugim kemijskim metodama tretiranja za zaštitu usjeva od bolesti. Prednosti korištenja gena otpornosti usjeva uključuje učinkovito smanjenje rasta patogena, minimalno oštećenje stanica domaćina, ne zahtijeva tretiranje pesticidima i što je najvažnije ekološki je prihvatljiva metoda (Gururani i sur., 2012).

3. ZAKLJUČAK

Biljke se ne mogu maknuti kako bi izbjegle ekološke izazove. Biotički stres, kojem su biljke izložene, rezultat je potencijalnih patogena: bakterija, gljiva, nematoda i insekata koji sprječavaju fotosintezu, i virusa koji se na račun domaćina repliciraju. Tako su biljke razvile mehanizme koji otkrivaju prisutnost patogena i potiču obrambeni odgovor, dok su patogeni razvili efektorske proteine koji mogu potisnuti obrambene odgovore domaćina. Biljni geni otpornosti imaju sposobnost prepoznavanja napada patogena te omogućuju kontranapad na patogene. Patogeni konstantno razvijaju otpornost na postojeće biljne gene otpornosti te na pesticide i druge kemikalije kojima se biljni usjevi tretiraju. Iz tog razloga su potrebna daljnja proučavanja interakcije između biljke i patogena kako bi se biljke mogle na ispravan i

učinkovit način zaštititi od uzročnika štete i bolesti. Biljke su razvile mehanizme otpornosti kojima upravljaju geni otpornosti, a proizvodi tih mehanizama mogu izravno ili neizravno prepoznati patogene i potaknuti obrambeni odgovor, odnosno aktivirati signalne puteve, određene receptore i molekule koje sudjeluju u obrani.

Unatoč napretku tih molekularnih mehanizama, naše razumijevanje odnosa između patogena i biljke je još uvijek slabo razvijeno. Iz tog razloga potrebno je puno više pažnje posvetiti proučavanju i istraživanju molekularnih mehanizmima napada patogena i obrane biljaka kako bi smo u budućnosti mogli razumjeti mehanizme. Razumijevanje tih mehanizama će omogućiti učinkovitu zaštitu poljoprivrednih usjeva, a samim time i hrane koja je danas rastućoj ljudskoj populaciji sve više potrebna.

4. LITERATURA

Ayer WA, Keifer P, MacKinnon SL (1999) Components from the phytotoxic extract of *Alternaria brassicicola*, a black spot pathogen of canola. *Phytochemistry* 51:215–21.

Beattie GA, Freeman BC (2008) An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. *The Plant Health Instructor*.

Boyd LA, Leach JE, Leung H, O'Sullivan DM, Ridout C (2013) Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. *Trends in Genetics* 29:233-240.

Dangl JL, Dietrich RA, Richberg MH (1996) Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *The Plant Cell* 8:1793-1807.

Dietrich RA, Maleck K (1999) Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? *Trends in Plant Science* 4:215-219.

Dodds PN, Rathjen JP (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature* 11:539-548.

Glazebrook J (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual reviews* 43:205-227.

Glazebrook J, Tootle TL, Zhou N (1999) Arabidopsis *PAD3*, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase. *The Plant Cell* 11:2419-2428.

Gururani MA, Nookaraju A, Pandey SK, Upadhyaya CP, Venkatesh J, Park SW (2012) Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 78:51-65.

Hammond-Kosack KE, Jones DGJ (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell* 8:1773-1791.

Higgins VJ , Owen B, Thaler JS (2004) The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. *Plant Physiology* 135:530-538.

Koch E, Slusarenko A (1990) Arabidopsis is susceptible to infection by a Downy Mildew Fungus. *The Plant Cell* 2:435-445.

McDowell JM1, Woffenden BJ (2003) Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends in Biotechnology*. 21:178-183.

Trewavas, AJ (2002) Plant intelligence: Mindless mastery. *Nature* 415:841.

Van Loon LC (1997) Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology* 103:753-765.